Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 4, Winter 2023, p. 817-827

Effect of Meristem Size and Scion Origin on Micrografting of some Sweet Cherry Cultivars *in vitro*

M.E. Naddaf[1], E. Ganji Moghadam[2]*, Gh. Rabiei[3], A. Mohammadkhani[4]

Received: 23-05-2021 Revised: 13-10-2021 Accepted: 18-10-2021 Available Online: 30-01-2023	**How to cite this article:** Naddaf, M.E., Ganji Moghadam, E., Rabiei, Gh., & Mohammadkhani, A. (2023). Effect of Meristem Size and Scion Origin on Micrografting of some Sweet Cherry Cultivars *in vitro*. *Journal of Horticultural Science 36*(4): 817-827. (In Persian with English abstract) **DOI**: 10.22067/jhs.2021.70383.1050

Introduction

Sweet Cherry (*Prunus avium*) belongs to the Rosaceae family, which due to vegetative propagation problems, *in vitro* propagation is recommended to increase mass and disease-free production. Micropropagation has many advantages over other vegetative methods. Although the most suitable organ that preserves the genetic characteristics of the cultivar is bud meristem, plant regeneration from meristem culture is difficult in many species of woody plants, so micro-grafting is a suitable technique to overcome these problems. The aim of this study was to investigate the effect of scion size and origin of commercial sweet cherry cultivars interact with micrografting on the vegetative rootstocks.

Materials and Methods

In this study, factorial experiment was used as a test unit in a completely randomized design (CRD) with two factors in five replications and ten seedlings per replication. The first factor was cultivar in seven levels (B: Bing, D: Dovomres, H: Haj Yousefi, P: Pishres, S: Siah- Mashhad, T: Takdaneh, Z: Zard) and the second factor was scion type in four levels (M1R1: 2 mm *in vivo* explant, M2R1: 5 mm *in vivo* explant , M1R2: 2 mm *in vitro* explant and M2R2: 5 mm *in vitro* explant). To prepare the scion, 1.5 to 2 cm long explants were isolated from shoot tips and then disinfected with 75% ethanol and 20% Sodium hypochlorite. After rinsing with distilled water, the shoot tips with 2 and 5 mm length were extracted for *in vivo* explants. *In vitro* explants were obtained from shoo tips that was previously established in MS culture medium with supplement of 1 mg.l^{-1} of BAP. The meristems were prepared in 2 and 5 mm and used as *in vitro* explant. 5 cm length *in vitro* shoots of sweet cherry 'Gisella 6' was used as rootstock. Micro-grafting was performed according to the standard method for sweet cherries. Micro-grafted plantlets were transferred to MS medium supplemented with 1 mg.l^{-1} BAP, and kept under low light (100 lux) condition for one week, then transferred to growth chamber at 27.1 °C photoperiods 16/8 hrs light/darkness (1500 lux). In order to induce root, grafted plantlets were transferred to Perlite: MS medium supplement with 1 mg.l^{-1} IBA. After rooting, plants were placed in polyethylene pots containing perlite: peatmoss (1:1) for acclimation. Micro-grafting success indices were recorded in each of the micro-grafted plantlets. The data were analyzed by SAS statistical software (9.1) and the means were compared by Duncan's multiple range test (1 and 5 % of probability levels).

Results and Discussion

The results showed that in all indices there was a significant difference between scion types and cultivar scion type interactions except grafting time, but there was no difference between cultivars (except longitudinal growth of scion). Among the scion types, the 5 mm *in vitro* scion (M2R2) had the highest micro-grafting success rate (42%), number of leaves (3.7), longitudinal growth (6.3 cm) and taken grafting time (two days). Finally, in

1, 3 and 4- Ph.D. Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, respectively.
2- Associate Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, I.R. Iran
(*- Corresponding Author Email: eganji@hotmail.com)

successful micro-grafted plants, 'Pishres' cultivar had better results in rooting (32.8%) and 'Zard' cultivar in acclimation (3.4%) traits. Probably the presence of leaves led to better nutrient supply and surface contact, so it mostly improved the success of micrografting technique. In this study, micro-grafting success indices were lower than previous reports using seedling rootstocks. This might be due to difficult grafting operations, poor rootstock-scion communication, low physiological activity, and high *in vitro* oxidase activity. In the type of scion, micro-grafting success rate of 5 mm *in vitro* scions (include leaf primordia), was better than 2 mm scions (without leaf primordia). These results were consistent with most reports in sweet cherries and other stone fruit that were more successful in micro-grafting using larger *in vitro* explant.

Conclusion

Based on our results, it can be concluded that the micro-grafting method in sweet cherry micro-propagation is a fast practical method with high potential for production and regeneration of healthy orchards, which is also possible for other cultivars. In micro-grafting success, *in vitro* explants are preferable to explants taken directly from *in vivo* mother trees, and the use of larger explants for scion is recommended due to the presence of leaf primordia in micro-grafting success. However, smaller-size explants are more likely to produce healthy plants.

Keywords: Acclimation, Leafy primordia, Shoot tips, Tissue culture, Virus-free

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱، ص. ۸۲۷-۸۱۷

بررسی اثر اندازه مریستم و منشاء پیوندک در ریزپیوندی گیلاس در شرایط درون شیشه‌ای

محمد اسماعیل نداف[۱]- ابراهیم گنجی مقدم[۲]*- غلامرضا ربیعی[۳]- عبدالرحمن محمدخانی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۶

چکیده

این مطالعه، با هدف بررسی تاثیر اندازه و منشاء پیوندک روی ریزپیوندی گیلاس در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی در طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۴ انجام شد. این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور اول: رقم در هفت سطح (’زرد‘، ’سیاه مشهد‘، ’دوم رس‘، ’بینگ‘، ’پیش رس‘، ’تکدانه ‘ و ’حاج یوسفی‘) و فاکتور دوم: نوع پیوندک در چهار سطح (ریزپیوندک با اندازه های دو و پنج میلی‌متری با منشاء درون شیشه‌ای و برون شیشه‌ای) بود. عملیات ریزپیوندی با ریزپیوندک‌هایی از نوک شاخه ارقام گیلاس روی پایه‌های ’گیزلا ۶ ‘ به روش اسکنه انجام شد. گیاهان ریزپیوندی شده، ابتدا برروی محیط کشت MS حاوی یک میلیگرم برلیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و بعد از سه هفته، در محیط پرلیت با محلول غذایی MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر ایندول بوتیریک اسید (IBA) قرار گرفتند و سپس به بستر پرلیت:پیت موس (به نسبت یک :یک) منتقل شدند. نتایج نشان داد که در همه شاخص‌ها بین تیمارهای نوع پیوندک و اثرات متقابل رقم در نوع پیوندک، به جز زمان گیرایی پیوند، اختلاف معنی‌دار بود، اما تفاوت معنی‌داری بین ارقام (به جز رشد طولی پیوندک) وجود نداشت. در نوع پیوندک، ریزپیوندک‌های پنج میلی‌متری با منشاء درون شیشه‌ای دارای بیشترین درصد موفقیت پیوند (۴۲ درصد)، تعداد برگ (۳/۷)، رشد طولی (۶/۳ سانتی‌متر) و زمان گیرایی پیوند (دو روز) بودند و در نهایت در بین تمام ریزپیوندهای موفق، درصد ریشه زایی، ۴۱ درصد و درصد سازگاری، ۲۵/۳ درصد بدست آمد. در مجموع استفاده از ریز پیوندک‌های ۵ میلی‌متری درون شیشه‌ای در همه ارقام گیلاس، برای ریزپیوندی روی پایه ’گیزلا‘ کارایی بهتری داشت.

واژه‌های کلیدی: آغازه‌ی برگی، سازگاری، عاری از ویروس، کشت بافت، نوک شاخه

مقدمه

به‌دلیل تنوع اقلیمی ایران کاشت محصولات باغی گامی موثر در راستای توسعه پایدار کشاورزی و ارزآوری اقتصادی می‌باشد. این مهم نیازمند تولید نهال‌های سالم، ارقام مطلوب و عاری از آلودگی است که در توسعه صنعت باغداری نقش مهمی دارد. گیلاس یکی از مهم‌ترین محصولات باغی است و ایران از نظر تولید این محصول در جایگاه سوم دنیا قرار دارد (FAO, 2015). درحال حاضر از دانهال‌های بذری به‌دلیل تفرق ویژگی‌های پایه و دیرباردهی و از قلمه به‌خاطر مشکلات ریشه‌زایی کمتر استفاده می‌شود و تکثیر درختان بیشتر از طریق پیوند صورت می‌گیرد اما روش‌های تکثیر پیوند نیز باعث گسترش عوامل بیماری‌زا خصوصاً ویروسی شده و موجب کاهش کمی و کیفی محصول می‌گردد (Ganji Moghadam and Buzari, 2007). از این رو باتوجه به اهمیت تولید درختان میوه و خسارات قابل توجه ناشی از بیماری‌ها، لزوم اجرای مدیریت صحیح در تولید مواد گیاهی عاری از ویروس ضروری است. تلاش‌های بسیاری برای استفاده از ترکیبات شیمیایی و کنترل ناقلین برای حذف عوامل ویروسی نیز تا کنون نتایج موفقیت‌آمیزی نداشته است (Hussain *et al*., 2014). باوجود مشکلات تکثیر از طریق روش‌های سنتی، ریزازدیادی می‌تواند منجر به تولید گیاهان سالم و یکنواخت در مدت زمان بسیار کمتری شود (Murashige *et al*., 1972). با این حال در روش‌های کشت

۱، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری اصلاح و فیزیولوژی میوه، استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- دانشیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: eganji@hotmail.com)
DOI: 10.22067/jhs.2021.70383.1050

بافت نیز ثبات ژنتیکی در انبوه گیاهان تولیدی در طول مدت ریزازدیادی تحت تاثیر عوامل زیادی قرار می‌گیرد ولی مشخصا مناسب‌ترین اندامی که باعث حفظ خصوصیات ژنتیکی رقم می‌گردد، مریستم جوانه‌هاست، از طرفی استفاده از کشت مریستم یکی از موثرترین روش‌های حذف عوامل بیماری‌زای ویروسی هست چراکه عدم وجود بافت آوندی و فضاهای بین سلولی و همچنین سرعت بالای تقسیم سلولی مانع از تکثیر عوامل ویروسی می‌شود. امروزه استفاده از مریستم انتهایی شاخساره متداول‌ترین شیوه برنامه‌های عاری‌سازی ویروسی در گیاهان، خصوصا درختان میوه می‌باشد (Navarro *et al.*, 1975).

علی‌رغم اهمیت بالای ریزازدیادی در توسعه کشت درختان میوه به دلیل مشکلات متعدد، ازدیاد و باززایی درون شیشه‌ای گیاهان چوبی نسبت به گیاهان علفی دارای محدودیت زیادی است. باززایی کامل در بسیاری از گونه‌های چوبی از کشت مریستم در شرایط کشت بافت نیز مشکل می‌باشد. از این رو ریزپیوندی برای این منظور پیشنهاد کارآمدتری است چراکه کشت مریستم به طور مستقیم، منجر به تولید گیاه کامل نمی‌گردد، چون در بسیاری از اوقات پس از کشت مریستم و به دست آمدن گیاهچه، تشکیل ریشه‌های نابجا مسئله‌ای جدی بوده و در مواردی ناممکن به نظر می‌رسد اما در این شرایط استفاده از فنون ریزپیوندی جایگزینی مناسب برای کشت مریستم خواهد بود. در ریزپیوندی، مریستم جدا شده بر روی پایه بذری یا پایه رویشی جایگذاری می‌شود و گیاهچه پس از رشد، واجد سیستم ریشه‌ای از پیش آماده خواهد بود. ریز پیوندی سبب تولید تعداد زیادی گیاه عاری از ویروس پیوندی در زمانی بسیارکوتاه می‌گردد (Navarro, 1988).

انجام موفق روش ریزپیوندی توسط کشت مریستم اولین بار در درختان میوه روی مرکبات گزارش شده است (Navarro *et al.*, 1975). بعد از آن این روش، در بسیاری از درختان میوه از جمله گیلاس (Amiri, 2006)، بادام (Isikalan, 2011)، هلو (Deogratias, 1986)، زردآلو (Piagnani *et al.*, 2006)، فندق (Abbas, *et al.*, 2008) و انگور (Aazami and Bagher, 2010) انجام شده است. ریزپیوندی کاربردهای بی‌شماری از جمله تولید گیاهان عاری از ویروس به وسیله پیوندک نوک مریستم (Abbas, *et al.*, 2008)، تشخیص ویروس از طریق ریزپیوندی پایه‌های حساس (Pathirana & McKenzie, 2005)، شناخت سریع ناسازگاری ژنتیکی پیوند (Jonard *et al.*, 1990)، تکثیر گیاهان سخت ریشه زا در شرایط درون شیشه ای (Wang *et al.*, 2010)، مطالعه فرآیندهای فیزیولوژیکی محل پیوند (Estrada-Luna *et al.*, 2002)، تکثیر گونه‌های خاص و تولید ترکیبات خاص (Richardson *et al.*, 1996) و همچنین تکثیر گیاهانی که در حالت طبیعی پیوند آنها بسیار مشکل است (Ramanayake and Kovoor, 1999) دارد.

در عملیات ریزپیوندی، استفاده از ریز پیوندک های درون شیشه ای (*in vitro*) نسبت به برون شیشه‌ای (*in vivo*)، به دلیل مشکل بودن عملیات پیوند در ابعاد بسیار کوچک گیاهان کشت بافتی و همچنین احتمال کمتر بودن درصد گیرایی پیوند، کمتر انجام می‌شود چون ریز پیوندک‌های *in vitro* حاوی ترکیبات فنولیک بیشتری هستند و غلظت بالای تنظیم کننده‌های رشدی نیز در آنها باعث افزایش فعالیت پلی فنول اکسیدازها و پراکسیدازها می‌شود و از این رو، احتمال قهوه ای و خشک شدن بافت پیوندی، درست قبل و بعد از پیوند بالا هست ولی بهر حال این ریزپیوندک ها گیاهان سالم‌تر و یکنواخت‌تری تولید می کنند (Hussain *et al.*, 2014).

پیوندک‌هایی که معمولاً برای عملیات ریزپیوندی در درختان هسته دار استفاده می‌شوند در اندازه بیشتر از یک سانتی‌متر به عنوان جوانه نوک شاخه یا کمتر از یک سانتی‌متر به عنوان مریستم جوانه تهیه می‌گردند، با این حال، اندازه ریزنمونه ممکن است در هر گونه گیاهی متفاوت باشد. با افزایش اندازه پیوندک، فراوانی پیوندهای موفق افزایش ولی درصد گیاهان عاری از ویروس کاهش می‌یابد، اگر چه این بستگی به عامل بیماری‌زا نیز دارد. درریزپیوندک‌های بزرگتر به دلیل همراه بودن با آغازه‌های برگی، موفقیت ریزپیوندی بیشتر است. احتمالا وجود برگ برای تامین مواد غذایی و سطح تماس بیشتر باعث بهبود پیوند می‌گردد ولی این درحالی است که از نظر آلودگی‌های ویروسی پیوندک‌های با اندازه کوچک تر مناسب تر هستند (Navarro *et al.*, 1975 ; Navarro, 1988).

در بررسی ریزپیوندی در هسته دارها از جمله هلو و زردآلو استفاده از ریزپیوندک‌هایی با ابعاد کوچکتر از پنج میلی‌متر، برروی پایه بذری هلو، در شرایط درون شیشه‌ای، درصد موفقیت در ریزپیوندی افزایش پیدا کرد که آلودگی همچنان پایین بود (Martinez *et al.*, 1979). در ریزپیوندی با استفاده از ریزپیوندک‌های پنج میلی‌متری بادام با سایر هسته‌دارها مشخص شد با افزایش اندازه ریزپیوندک و تعداد آغازه‌های برگی آن، میزان موفقیت در گیرایی پیوند تا ۵۰ درصد افزایش یافته، حال آنکه درصد گیاهان ویروس‌زدایی شده کاهش پیدا کرد (Martinez and Gradziel, 2001). در ریزپیوندی گیلاس روی پایه‌بذری آلبالو با اندازه پیوندک پنج تا ۱۰میلی‌متری بیش‌ترین درصد بقا و موفقیت پیوند بدست آمد (Amiri, 2006).

این مطالعه با هدف بررسی تاثیر اندازه پیوندک و منشا آن از نظر تولید در شرایط درون شیشه‌ای یا برون شیشه‌ای بر موفقیت ریزپیوندی، هفت رقم گیلاس تجاری روی پایه رویشی ' گیزلا ۶ ' در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع

طبیعی خراسان رضوی در طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ انجام شد. در این بررسی از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کـاملاً تصـادفی بـا دو فاکتور در پنج تکرار و ده گیاهچه در هر تکرار به عنوان واحد آزمایشی استفاده شد که فاکتور اول، رقم در هفت سـطح (بینـگ :B، دوم رس :D، حاج یوسفی :H، پیش‌رس :P، سیاه مشهد :S، تکدانه :T، زرد:Z) و فاکتوردوم، نوع ریزنمونه در چهار سطح (ریزنمونه دو میلـی‌متـری از محیط برون شیشه‌ای: M1R1، ریزنمونه پنج میلـی‌متـری از محـیط برون شیشه‌ای: M2R1، ریزنمونه پـنج میلـی‌متـری از محـیط درون شیشه‌ای: M1R2، ریزنمونه دو میلی‌متری از محیط درون شیشـه‌ای: M2R2) بود.

تهیه پایه

جهت تولید پایه از گیاهچه‌های 'گیزلا ۶' که از طریق کشت بافت تولیـد شـده بودنـد (Daneshvar Hossini, *et al*., 2010) اسـتفاده گردید، این پایه، نیمه پاکوتاه، زودبارده، دارای عملکرد بالا و سازگار با اکثر ارقام تجاری بوده که در بیشتر شرایط اقلیمی منـاطق ایـران نیـز قابل کشت است. گیاهچه‌ها را جهت ریزپیوندی، زمانی که ساقه آنهـا به قطر مناسب (بیش از پنج میلی‌متر) رسیدند، از محیط رشد خود جدا نموده و بعد از برش، ابتدا و انتهای آنها با طول بیش از دو سانتی‌متـر به عنوان پایه استفاده شدند.

تهیه پیوندک

برای تهیهٔ پیوندک، در فصل بهار از شاخسـاره‌هـای هفـت رقـم گیلاس مورد نظر در ایسـتگاه تحقیقـات کشـاورزی گلمکـان، نمونـه برداری شـد. در آزمایشـگاه جوانـه‌هـای شـاخه بـه طـول ۱/۵ تـا دو سانتی‌متر جدا شدند و ابتدا با اتانول ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و پس از آن با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصـد بـه مـدت ده دقیقـه گنـدزدایی شدند. سپس در شرایط استریل بعد از سه بـار آبشـویی بـا آب مقطـر، فلس‌های جوانه‌های نوک شاخه حذف شد و ریزنمونه‌های مریسـتمی جدا شدند. برای ریزپیوندک‌های *in vivo* مستقیما از این ریزنمونـه‌هـا در اندازه دو و پنج میلی‌متری استفاده شـد، همچنـین تعـدادی از ایـن ریزنمونـه‌هـا در لولـه‌هـای آزمـایش حـاوی محـیط کشـت MS (Murashige and Skoog, 1962) با یک میلی‌گـرم در لیتـر BAP، کشت شدند و پس از رشد با آغازه‌های برگی به اندازه دو تا پنج میلـی متر جدا شده و به عنوان ریزپیوندک‌های *in vitro* استفاده گردیدند.

انجام ریزپیوندی

ریزپیوندی برابـر بـا روش اسـتاندارد بـرای گـیلاس انجـام شـد (Amiri, 2006). تمام شرایط ریزپیونـدی بـه جـز نـوع رقـم، انـدازه پیونـدک و نـوع پیونـدک از نظـر منشـا، ثابـت در نظـر گرفتـه شـد. ریزنمونه‌های تهیـه شـده در شـرایط *in vitro* و *in vivo* بـه عنـوان ریزپیوندک و ساقه‌های تولیدی از گیاهچه‌هـای رویشـی 'گیـزلا ۶' رشد یافته در *in vitro* به‌عنوان پایه استفاده شد. انجام ریزپیوندی زیر استریومیکروسکوپ در شرایط استریل انجام شد، به این صورت که در قسمت انتهایی پایه رویشی، برشی به ابعـاد یـک میلـی‌متـر ایجـاد و ریزپیوندک به ابعاد دو تا پنج میلی‌متـر در بـرش پایـه بـا روش پیونـد اسکنه جایگذاری گردید و سـپس توسـط پوشـش چسـب پارچـه ای استریل محل پیوند آن بسته شد.

رشد گیاهان پیوندی

ریزنمونه‌های پیوندی ابتدا به لوله‌های محیط کشت MS همراه با یک میلی گرم در لیتر BAP منتقل شدند که دارای ۳۰ گـرم در لیتـر سوکروز و ۲/۸ گرم در لیتر فایتوژل بود. گیاهان پیوند شـده ابتـدا بـه مدت یک هفته در شرایط نور کم (۱۰۰ لوکس) و سپس به مدت سـه هفته تا زمان گیرایـی موفـق پیونـد، در شـرایط دمـای ۱±۲۷ درجـه سانتی‌گراد و نور ۱۵۰۰ لوکس و تناوب نوری ۱۶ سـاعت روشـنایی و هشت ساعت تاریکی در اتاقک رشد با شرایط یکسان نگهداری شدند. جهت ریشه‌زایی، گیاهچه‌های ریزپیوندی به محیط کشـت پرلیـت بـا محلول غذایی MS همراه با یک میلی‌گرم در لیتر IBA منتقل شدند. گیاهـان ریزپیونـدی طـی هشـت هفتـه در شـرایط درون شیشـه‌ای نگهداری شدند و بعد از ریشه‌زایـی جهـت سـازگاری در گلـدان‌هـای حاوی پرلیت:پیت موس (به نسبت یک: یک) داخل ظروف پلی‌اتیلنـی پوشش‌دار با فیلتر قرار گرفتند.

اندازه‌گیری شاخص‌های پیوند

شـاخص‌هـای تعیـین کننـده در موفقیـت پیونـد در هرکـدام از گیاهچه‌های ریزپیوند شـده انـدازه‌گیـری شـد. شـاخص‌هـای درصـد موفقیت پیوند (نسبت پیوندک‌های رشد کرده به کـل پیونـدها بعـد از چهار هفته)، زمان گیرایی پیوند (مدت زمان بین پیوند تا زمـان شـروع رشد و باز شدن برگ‌های پیوندک)، تعداد برگ‌های تولیـد شـده روی پیوندک (سه هفته پس از گیرایی پیوند) و میزان رشد پیوندک (انـدازه گیری طول قسمت رشد کرده پیوندک سه هفته پس از گیرایی) ثبـت گردید و همچنین باتوجه به اینکه در تمامی آزمایش نوع پایه ('گـزیلا ۶') یکسان بود و تنها نوع رقم پیوندک متفاوت بود، فقط در بین ارقام درصد ریشه‌زایی (در زمان انتقال نمونه‌ها به گلدان) و درصد سازگاری (۳۰ روز بعد از انتقال گیاهچه‌های ریزپیوندی) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

درپایان داده‌های بدست آمده پـژوهش، توسـط نـرم‌افـزار آمـاری SAS (نسخه ۹/۱) تجزیه و تحلیل آماری گردیـد و میـانگین داده‌هـا توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پـنج درصـد

مقایسه شد. نمودارها همچنین با نرم‌افزار Excel۲۰۱۳ ترسیم شدند.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش نشان داد که در اثر مستقل نوع پیوندک، در تمامی شاخص‌های ریزپیوندی، تفاوت معنی‌داری وجود دارد (در سطح یک درصد) اما در اثر مستقل رقم، تنها در شاخص رشد طولی ریزپیوندک اختلاف معنی‌دار بود و در اثرات متقابل رقم در نوع پیوندک، نیز در همه شاخص‌های ریزپیوندی اختلاف معنی‌دار بود (در سطح پنج درصد) (به جز شاخص زمان گیرایی (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس عوامل موثر بر شاخص‌های ریزپیوندی در گیلاس

Table 1- The ANOVA results for the factors affecting micrografting indices in sweet cherry

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean of Square			
		موفقیت پیوند Micrografting successful (%)	زمان گیرایی Micrografting time (day)	تعداد برگ Number of leaf	طول شاخه Shoot length (cm)
رقم Cultivar (C)	6	160.9 ns	3.6 ns	0.35ns	9.7 *
نوع پیوندک Scion type (ST)	3	3275**	94.6 **	23.7 **	81.4 **
C ×ST	18	173.5*	3.03 ns	2.8 *	2.1 *
اشتباه آزمایشی Error	112	74.3	1.9	1.17	1.8
ضریب تغییرات C.V (%)	-	19.6	15.1	13.8	16.2

ns، ** و * به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively

درصد موفقیت ریزپیوندی

در شاخص درصد موفقیت پیوند، در فاکتور نوع پیوندک، ریزپیوندک‌های پنج میلی‌متری با منشا درون شیشه ای، بیشترین میزان موفقیت پیوند (۴۲ درصد) و ریزپیوندک‌های دو میلی‌متری با منشا برون شیشه‌ای کمترین درصد موفقیت (۲۰ درصد) را دارا بودند. در فاکتور رقم نیز بیشترین درصد موفقیت پیوند مربوط به رقم 'پیش رس' (۳۲/۸ درصد) و کمترین آن در رقم ' حاج یوسفی' (۲۵/۹ درصد) بود. همچنین در بین اثرات متقابل رقم و نوع پیوندک، بیشترین درصد موفقیت پیوند در پیوندک‌های دو میلی‌متری رقم 'بینگ' با منشا درون شیشه‌ای (۴۸/۵ درصد) و کمترین آن نیز در پیوندک‌های مریستمی دو میلی‌متری از رقم ' سیاه' با منشا درون شیشه‌ای (۱۵/۱ درصد) بود. همچنین بطور کلی در تمامی آزمایشات، میانگین درصد موفقیت ریزپیوندی ۲۹/۱ درصد بدست آمد (جدول ۲).

زمان گیرایی ریزپیوندها

درمورد شاخص زمان گیرایی پیوند، در بین نوع پیوندک، ریزپیوندک‌های مریستمی پنج میلی‌متری با منشا درون شیشه ای کوتاه‌ترین زمان گیرایی پیوند (میانگین ۲ روز) و ریزپیوندک های دو میلی‌متری با منشا برون شیشه‌ای، طولانی‌ترین زمان گیرایی (۵/۸ روز) را دارا بودند. در بین ارقام نیزکوتاه‌ترین زمان مربوط به رقم 'زرد' (۳/۴ روز) و طولانی‌ترین زمان گیرایی در رقم'بینگ' (۴/۵ روز) بدست آمد. در بین اثرات متقابل رقم و نوع پیوندک، نیز کوتاه‌ترین زمان توسعه و رشد پیوندک‌ها در ریزپیوندهای موفق مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی پنج میلی‌متری رقم 'تکدانه' با منشا درون شیشه‌ای (۱/۴ روز) و طولانی‌ترین زمان گیرایی نیز در میانگین پیوندک‌های مریستمی دو میلی‌متری در رقم' بینگ' با منشا برون شیشه‌ای (۷ روز) بود. همچنین در کل آزمایش ریزپیوندی، میانگین زمان گیرایی پیوند ۳/۹ روز بود (جدول ۳).

تعداد برگ ریزپیوندک

میزان برگ تولید شده توسط پیوندک در گیاهان ریزپیوندی سه هفته بعد از گیرایی پیوندها ثبت گردیدند که نتایج نشان داد، بیشترین تولید برگ در ریزپیوندهای موفق نیز مانند سایر شاخص‌های پیوند مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی پنج میلی‌متری با منشا درون شیشه‌ای (۳/۷ عدد) و ریزپیوندک‌های مریستمی دو میلی‌متری با منشا برون شیشه‌ای، کمترین میزان برگ (۱/۷ عدد) را داشت. در بین

ارقام تفاوت اندکی وجود داشت و ارقام 'دوم رس' و 'تکدانه' بیشترین تعداد برگ (۲/۹ عدد) را داشتند. در بین اثرات متقابل رقم و نوع پیوندک، بهترین نتیجه مربوط به رقم' تکدانه ' در ریزپیوندک‌های مریستمی پنج میلی‌متری با منشا درون شیشه‌ای (۴/۹ عدد) و کمترین آن نیز مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی دو میلی‌متری در همین رقم با منشا برون شیشه‌ای بود (۱/۴ عدد) و در کل نتایج آزمایش، میانگین تعداد برگ ریزپیوندک‌های گیاهان ۲/۷ عدد بدست آمد (جدول ۴).

جدول ۲- تاثیر اندازه مریستم و منشا پیوندک روی درصد موفقیت ریزپیوندی در گیلاس

Table 2- The effect of meristem size and scion origin on micrografting successful (%) in sweet cherry

ارقام Cultivar	نوع پیوندک Scion type				درصد موفقیت پیوند در ارقام Micrografting success (%) in cultivar
	M1R1	M1R2	M2R1	M2R2	
B	26.6 cd	16.2 de	36.4 ab	48.5 a	31.9 A
D	19.5 de	29.0 bc	23.8 cd	37.3 ab	27.4 B
H	16.9 de	18.7 de	28.1 bc	39.9 ab	25.9 B
P	24.8 cd	32.6 bc	32.0 bc	41.8 ab	32.8 A
S	16.0 de	15.1 e	36.1 ab	38.7 ab	26.4 B
T	17.8 de	35.6 ab	24.1 cd	48.1 a	31.4 A
Z	18.2 de	19.4 de	33.7 ab	39.8 ab	27.8 B
نوع پیوندک Scion type	20.0 D	23.8 C	30.6 B	42.0 A	29.1

ارقام: بینگ :B، دوم رس :D، حاج یوسفی :H، پیش‌رس :P، سیاه مشهد :S، تکدانه :T، زرد:Z و نوع پیوندک: ریزنمونه دو میلی‌متری از محیط برون شیشه‌ای: M1R1، ریزنمونه پنج میلی‌متری از محیط برون شیشه‌ای: M2R1، ریزنمونه دو میلی‌متری از محیط درون شیشه‌ای: M1R2، ریزنمونه پنج میلی‌متری از محیط درون شیشه‌ای:M2R2 می‌باشد.

Cultivars: Bing: B; Dovomres: D; Hajyousefi: H; Pishres: P; Siah-e Mashhad: S; Takdaneh: T; Zard: Z and Scion Types: 2 mm *in vivo*: M1R1, 5 mm *in vivo*: M2R1, 2 mm *in vitro*: M1R2, 5mm *in vitro*: M2R2.

*حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی دار در بین میانگین ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می باشد.

*Means with at least one similar letter are not significant different based on Duncan's multiple range at 5% of probability level.

جدول ۳- تاثیر اندازه مریستم و منشا پیوندک روی زمان گیرایی پیوند در گیاهان ریزپیوندی گیلاس

Table 3- The effect of meristem size and scion origin on taking time (days) in micrografted plant in sweet cherry

ارقام Cultivar	نوع پیوندک Scion type				زمان گیرایی پیوند در ارقام Taking time(days) in cultivar
	M1R1	**M1R2**	**M2R1**	**M2R2**	
B	7.0 f	6.3 ef	3.3 cd	1.6 ab	4.5 B
D	4.7 de	4.6 de	2.7 bc	3.0 bcd	3.7 AB
H	5.2 def	4.3 de	3.0 bcd	2.4 bc	3.7 AB
P	6.1 ef	4.9 de	4.6 de	1.8 ab	4.3 AB
S	5.5 def	3.8 cd	3.3 cd	2.2 bc	3.7 AB
T	6.5 ef	5.7 def	3.5 cd	1.4 a	4.3 AB
Z	5.8 def	3.0 bcd	3.1 bcd	1.6 ab	3.4A
نوع پیوندک Scion type	5.8 D	4.6 C	3.3 B	2.0 A	3.9

*حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی دار در بین میانگین ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می باشد

*Means with at least one similar letter are not significant different based on Duncan's multiple range at 5% of probability level.

رشد طولی پیوندک

میزان رشد پیوندک، سه هفته پس از گیرایی اندازه‌گیری گردید. با توجه به نتایج بیشترین میزان رشد پیوندک همچنان مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی پنج میلی‌متری با منشا درون شیشه‌ای بود (۶/۳ سانتی‌متر) و ریزپیوندک‌های مریستمی دو میلی‌متری با منشا برون شیشه‌ای، کمترین میزان رشد طولی را داشتند (۲/۷ سانتی‌متر) و در بین ارقام بیشترین و کمترین میزان رشد به ترتیب مربوط به ارقام 'دوم رس' (۵/۷ سانتی‌متر) و ' سیاه ' (۳/۸ سانتی‌متر) بود. در اثرات متقابل رقم و نوع پیوندک، نیز بهترین نتیجه مربوط به ریزپیوندک های مریستمی پنج میلی متری رقم 'پیش رس'با منشا درون شیشه ای (۷/۹ سانتی‌متر) و کمترین میزان رشد پیوندک مربوط به ریزپیوندک‌های مریستمی دو میلی‌متری رقم 'بینگ ' با منشا برون شیشه‌ای (۱/۹ سانتی‌متر) بود و در کل نتایج آزمایشات ریزپیوندی، میانگین رشد طولی ریزپیوندک ۴/۶ سانتی‌متر بدست آمد (جدول ۵).

جدول ٤- تاثیر اندازه مریستم و منشاء پیوندک روی تعداد برگ تولیدی در گیاهان ریزپیوندی گیلاس

Table 4- The effect of meristem size and scion origin on number of leave in micrografted plant in sweet cherry

ارقام Cultivar	نوع پیوندک Scion type				تعداد برگ تولیدی در ارقام Leaf number in cultivar
	M1R1	M1R2	M2R1	M2R2	
B	1.9 f	3.6 de	3.6 bc	2.7 cd	4.0 C
D	4.1 cd	5.5 bc	2.8 cd	3.1 bcd	5.7 A
H	3.0 def	4.2 cd	3.0 bcd	3.9 bc	4.6 BC
P	2.6 ef	4.7 cd	2.1 cde	3.2 bc	5.3 AB
S	2.3 ef	3.3 de	3.0 bcd	3.3 bc	3.8 C
T	2.5 ef	4.5 cd	3.7 bc	4.9 a	4.1 C
Z	2.2 ef	3.9 cde	2.5 cd	4.6 ab	4.7BC
نوع پیوندک Scion type	2.7 D	4.2 C	3.0 B	3.7 A	4.6

*حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

❇Means with at least one similar letter are not significant different based on Duncan's multiple range at 5% of probability level.

جدول ۵- تاثیر اندازه مریستم و منشاء پیوندک روی رشد طولی پیوندک در گیاهان ریزپیوندی گیلاس

Table 5- The effect of meristem size and scion origin on scion shoot length (cm) in micrografted plant in sweet cherry

ارقام Cultivar	نوع پیوندک Scion type				رشد طولی پیوندک در ارقام Scion shoot length (cm) in cultivar
	M1R1	M1R2	M2R1	M2R2	
B	1.9 f	3.6 de	4.1 cd	6.3 ab	4.0 C
D	4.1 cd	5.5 bc	6.9 ab	6.2 ab	5.7 A
H	3.0 def	4.2 cd	5.6 bc	5.7 bc	4.6 BC
P	2.6 ef	4.7 cd	6.0 abc	7.9 a	5.3 AB
S	2.3 ef	3.3 de	3.9 cde	5.6 bc	3.8 C
T	2.5ef	4.5 cd	4.1 cd	5.2 bc	4.1 C
Z	2.2 ef	3.9 cde	5.5 bc	6.9 ab	4.7BC
نوع پیوندک Scion type	2.7 D	4.2 C	5.2 B	6.3 A	4.6

*حروف غیرمشابه در جدول، بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

*Means with at least one similar letter are not significant different based on Duncan's multiple range at 5% of probability level.

ریشه‌زایی و سازگاری گیاهان ریزپیوندی

میزان ریشه‌زایی گیاهچه‌های ریزپیوندی موفـق در شـرایط درون شیشه‌ای، چهار هفته پـس از رشـد در محـیط ریشـه زایـی و میـزان سازگاری آنها سه هفته پس از انتقال به گلـدان و ظـرف پلـی اتیلنـی اندازه‌گیری شد (شکل ۱). نتایج آزمایش نشان داد که تفاوت ارقام، در هر دو شاخص درصد ریشه‌زایی و درصد سازگاری گیاهان ریزپیونـدی معنی‌دار نبود (جدول ۶).

نتایج مقایسه میانگین بین ارقـام نیـز نشـان داد کـه در شـاخص درصد ریشه‌زایی بیش‌ترین میزان مربوط به رقم 'حاج یوسفی' (۵۴/۵ درصد) و کمترین آن در رقم 'تکدانه'(۲۹/۳ درصد) بود و میانگین کل درصد ریشه‌زایی ارقام ۴۱ درصد بدسـت آمـد امـا در شـاخص درصـد سازگاری بیش‌ترین میزان مربوط به رقم 'پـیش‌رس'(۳۱/۷ درصـد) و کمترین آن مربوط به رقم 'تکدانه'(۱۵/۹ درصد) بود و میـانگین کـل درصد سازگاری برای ارقام گیلاس ۲۵/۳ درصد بدست آمد (شکل ۲).

بحث

این مطالعه اولین گزارشی است که جهت ریزپیوندی گـیلاس، از پایه رویشی کشت بافتی استفاده شده است، در گـزارش‌هـای پیشـین برای ریزپیوندی گیلاس و حتی سایر هسته دارها از دانهال‌های بذری استفاده شده است.

نتایج این مطالعه مشخص کرد که موفقیت ریزپیوندی در شـرایط درون شیشه‌ای تحت تاثیر نوع رقم نیست امـا نـوع پیونـدک از نظـر اندازه و منشا در آن موثر است. عدم تفاوت معنی‌دار در ارقـام مختلـف در بیشتر شاخص‌های ریزپیوندی نشان از میزان شباهت ژنتیکی زیـاد بین ارقام مـورد آزمـایش و همچنـین سـازگاری نسـبی مشـابه ارقـام گیلاس با پایه 'گیزلا ۶' می‌باشد.

بطورکلی موفقیت ریزپیوندی در شرایط درون شیشه‌ای باتوجه به مزیت‌های فراوان آن، نسبت به شرایط مزرعه‌ای پایین است (خصوصا

در درختان میوه هسته‌دار). شاخص‌های موفقیت پیوند در این مطالعه نیز کمتر از گزارش‌های ریزپیوندی روی پایه بذری بود. در برخی واحدهای آزمایشی نکروزه شدن پیوندک‌ها بسیار بالا و گیرایی پیوند خصوصا در ریزپیوندک‌های مریستمی با اندازه کوچک دو میلی‌متری بسیار پایین و ناچیز بود، این نتایج ضعیف ممکن است بدلیل عملیات سخت پیوند، ارتباط ضعیف پایه و پیوندک، فعالیت فیزیولوژیکی پایین و فعالیت بالای اکسیدازها در بافت پیوندی در شرایط درون شیشه‌ای باشد (Hussain *et al*., 2014).

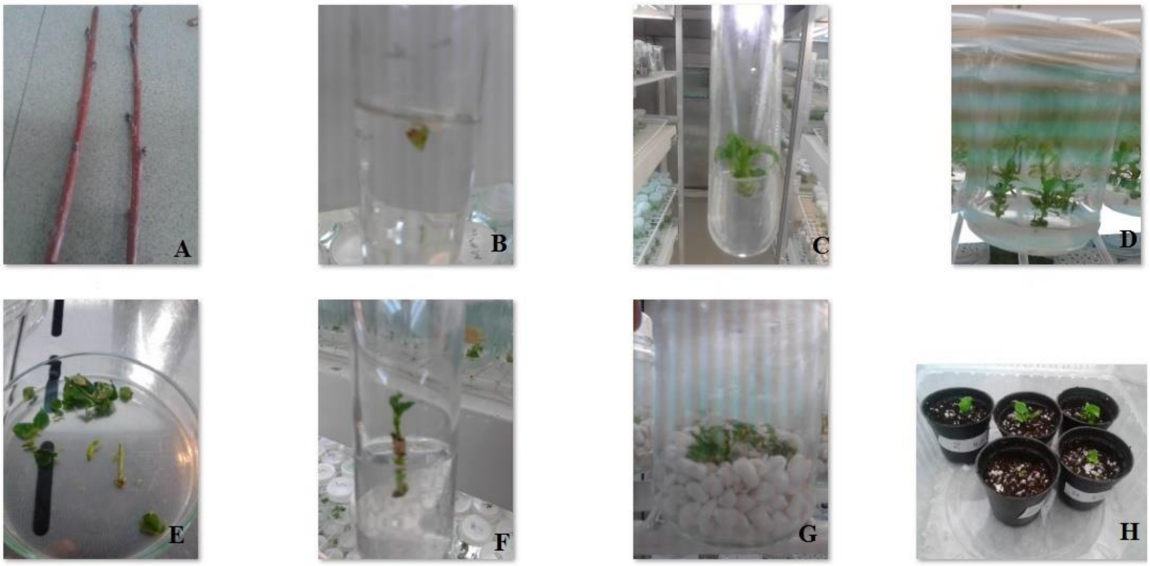
جدول ٦- تجزیه واریانس تاثیر رقم روی شاخص‌های ریشه زایی و سازگاری در گیاهان ریزپیوندی گیلاس

Table 6- The ANOVA results for the effect of cultivar on rooting and acclimation percentages in micrografted plant in sweet cherry

منابع تغییرات **S.O.V**	درجه آزادی **DF**	میانگین مربعات **Mean squares** درصد ریشه زایی **Rooting percentage**	 درصد سازگاری **Acclimation percentage**
رقم Cultivar	6	18.3 n.s	24.5 n.s
اشتباه آزمایشی Error	24	35.7	25.6
ضریب تغییرات C.V (%)	-	17.4	23.7

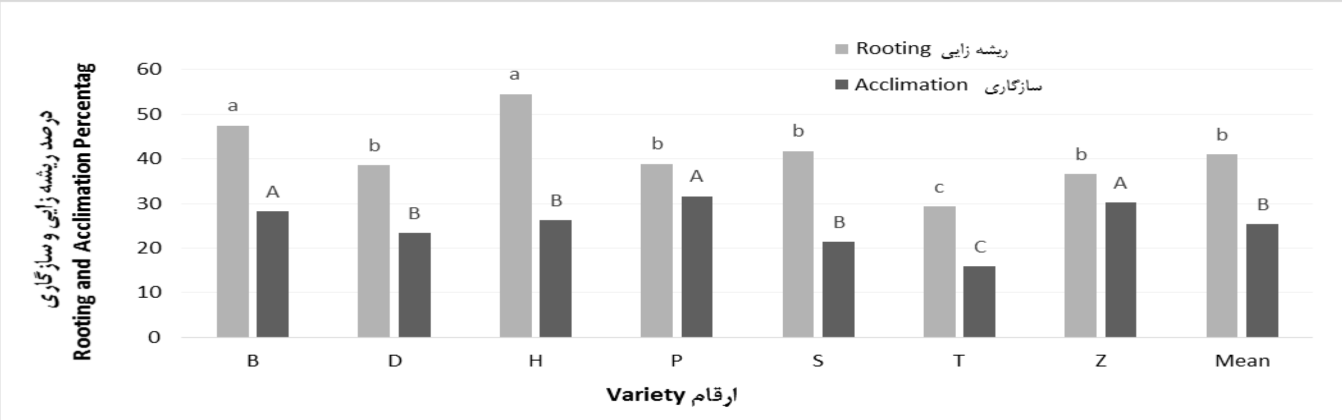
ns، ** و * به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively



شکل ۱- مراحل کشت مریستم و ریزپیوندی گیلاس در شرایط درون شیشه ای. A: تهیه جوانه نوک شاخه. B: آماده سازی و کشت مریستم C: استقرار ریزنمونه D: تکثیر شاخه E: آماده سازی ریزپیوندک و پایه F: گیاهریزپیوندی G: ریشه‌زایی H: سازگاری گیاهان ریزپیوندی

Figure 1- Stages of micrografting in sweet cherry *in vitro*: A: Preparation of scion shoot tips; B: Preparation and cultivation of meristem; C: Establishment of explant; D: Shoot proliferation; E: Scion and rootstock preparation; F: Micrografted plant; G. Rooting; H. Acclimation of micrografted plant



شکل ۲- میزان ریشه زایی و سازگاری گیاهچه های ریزپیوندی در ارقام مختلف گیلاس

Figure 2- The rooting and acclimation percentage in micrografted plantlets in sweet cherry cultivars

پیوندک‌های مورد استفاده در عملیات ریزپیوندی معمولاً در اندازه استاندارد کمتر از یک سانتی‌متر تهیه می‌گردند با این حال، اندازه ریزپیوندک ممکن است با توجه به نوع گونه گیاهی متفاوت باشد. با افزایش اندازه ریزپیوندک، درصد گیرایی پیوند افزایش، ولی درصد گیاهان عاری از ویروس کاهش می‌یابد. موفقیت ریزپیوندی در ریزپیوندک‌های بزرگتر، پنج میلی‌متری با آغازه‌های برگی که در محیط *in vitro* تهیه شده بودند، بیشتر از ریزپیوندک‌های کوچکتر، دو میلی‌متری بدون آغازه برگی بود. وجود برگ برای تامین مواد غذایی و سطح تماس بیشتر ریزپیوندک‌های بزرگتر باعث بهبود پیوند می‌گردد ولی این درحالی است که از نظر آلودگی‌های خصوصا ویروسی منابع مریستمی کوچک تر بهترند (Navarro, 1988)، این نتایج موافق با گزارش ریزپیوندی گیلاس 'سیاه مشهد' روی پایه بذری آلبالو بود که با اندازه ریزپیوندک از پنج تا ۱۰میلی‌متر، بیشترین درصد موفقیت ریزپیوندی (۶۵ درصد) با پیوند اسکنه با خیساندن محل پیوند با نمک‌های محلول MS بدست آمد (Amiri, 2006).

در بررسی ریزپیوندی ارقام هلو، با استفاده از ریزپیوندک مریستمی ۵ میلی‌متری همراه با دو آغازه‌ی برگی روی پایه‌های مختلف دانهالی، درصد موفقیت در ریزپیوندی در شرایط درون شیشه ای افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد و میزان آلودگی نیز پایین بود (Navarro *et al*., 1975). درصد موفقیت پیوند در ریزپیوندی زردآلو با ریزپیوندک‌هایی به ابعاد دو تا پنج میلی‌متر برروی شاخساره‌های بدون ریشه هلو بذری، در حدود ۴۰ درصد بدست آمد (Martinez *et al*., 1979). در ریزپیوندی بادام رقم 'نان پاریل' بر روی پایه‌های مختلف هسته‌دارها، ۵۰ درصد موفقیت ریزپیوندی با ریزنمونه‌های پنج میلی‌متری بدست آمد (Martinez and Gradziel, 2001). در ریزپیوندی بادام مشخص شد با افزایش اندازه پیوندک نوک شاخه به ۵ میلی‌متر و افزایش تعداد آغازه‌های برگی، میزان موفقیت پیوند افزایش ولی درصد گیاهان عاری از ویروس کاهش پیدا کرد (Lauri *et al*., 2001).

نتیجه‌گیری

روش ریز پیوندی در ریزازدیادی گیلاس، یک روش عملی سریع با پتانسیل بالا برای تولید و بازسازی باغ‌های سالم می‌باشد، باتوجه به اینکه در این تحقیق بین ارقام مختلف در بیشتر شاخص‌های ریزپیوندی تفاوتی مشاهده نشد، استفاده از این روش برای سایر ارقام نیز امکان‌پذیر می‌باشد. در موفقیت ریزپیوندی، ریزپیوندک‌های تولید شده در شرایط درون شیشه‌ای در مقایسه با ریزپیوندک‌هایی که مستقیما از درختان باغ مادری گرفته می‌شوند، ارجحیت دارد و همچنین استفاده از ریزنمونه‌های بزرگتر برای پیوندک به دلیل وجود آغازه برگی در موفقیت ریزپیوندی توصیه می‌گردد هرچند که احتمال تولید گیاه سالم در ریزنمونه‌های کوچکتر بیشتر می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش، به عنوان بخشی از پروژه ملی تولید گیاهان سالم و عاری از ویروس در هسته‌دارها محسوب می‌گردد که در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ اجرا شده است، لذا از مسئولین و کارکنان بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی خصوصا آزمایشگاه کشت بافت باغبانی این مرکز قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Aazami, M., & Bagher, M. (2010). *In vitro* micro-grafting of some Iranian grapevine cultivars. *Romanian Biotechnology* 15*:* 5576-5580.
2. Abbas, M., Khan, M., Fatima, B., Iftikhar, Y., Mughal, S., Jaskani, M., Khan, I., & Abbas, H. (2008). Elimination of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) and production of certified citrus plants through shoot-tip micrografting. *Pakistan Journal of Botany* 40: 1301-1312.
3. Amiri, M. (2006). *In vitro* technique to study the shoot tip grafting of Sweet cherry (*Prunus avium* L. var Seeyahe Mashad. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 41: 151-154.
4. Daneshvar Hossini, A., Ganji Moghadam, E., & Anahid, S. (2010). Effects of media cultures and plant growth regulators in micro propagation of 'Gisela 6' rootstock. *Annals of Biological Research 1*(2): 135-141.
5. Deogratias, J., Lutz, A., & Dosba, F. (1986). *In vitro* micrografting of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* L. Batsch to produce virus-free plants. *Acta Horticulturae* 193: 139–45.
6. Estrada-Luna, A., López-Peralta, C., & Cárdenas-Soriano, E. (2002). *In vitro* micrografting and histology of the graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia spp*.). *Science Horticulture* 92:317-327.
7. FAO. (2015). FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Http: //faostat.fao.org/faostat.
8. Ganji Moghadam, E., & Buzari, N. (2007). *Practical and practical guide to Cherry*. Agricultural Extension Education and Extensions Press, Iran, 344p. (In Persian)
9. Hussain, G., Wani, M., Mir, M., Rather, Z., & Bhat, K. (2014). Micrografting for fruit crop improvement. *African Journal of Biotechnology 13*(25): 2474-2483.
10. Isikalan, C., Namli, S., Akbas, F., & Erol, A. (2011). Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar 'Nonpariel'. *Australian Journal of Crop Science* 5: 61-65.
11. Jonard, R., Lukman, D., Schall, F., & Villemur, P. (1990). Early testing of graft incompatibilities in apricot and lemon trees using *in vitro* techniques. *Science Horticulture* 43: 117-128.
12. Lauri, P., Caboni, E., & Damno, C. (2001). *In vitro* adventitious shoot regeneration from vegetative apices of almond and other *prunus* species. *Acta Horticulturae* 560: 403-406.
13. Martinez, J., Hugard, J., & Jonard, R. (1979). The different grafting of shoot tips realized in vitro between Peach (*Prunus persica* Batsch), Apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Myrobolan (*Prunus cerasifera* Ehrh). *Comala Ren Academic Science* 288: 759-762.
14. Martinez-Gomez, P., & Gradziel, T.M. (2001). *In vitro* micrografts in almond and their application in breeding programs. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology* 11: 313-315.
15. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiolgy of Plant* 15: 473-497.
16. Murashige, T., Bitters, W., Rangan, T., Nauer, E., Roistacher, C., & Holliday, P. (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *Horticulture Science* 7: 118–119.
17. Nas, M., & Read, P. (2003). Simultaneous micrografting rooting and acclimatization of micropropagated American chestnut grapevine and hybrid hazelnut. *European Journal of Horticultural Science* 68: 234-237.
18. Navarro, L. (1988). Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Horticulturae* 227: 43–55.
19. Navarro, L., Roistacher, C., & Murashige, T. (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virusfree citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 100: 471–479.
20. Pathirana, R., & McKenzie, M. (2005). Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 11-18.
21. Piagnani, M., Prinsi, B., & Bassi, D. (2006). Experimental approaches to *in vitro* grafting in *Prunus armeniaca* and *P. spinosa*. *Horticulture Science 20*(3): 224-230.
22. Rafail, S., & Mosleh, M. (2010). Factors involved in micropropagation and shoot tip grafting of apple *Malus domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus sp.* L.). *Tropentag World Food System* – A Contribution from Europe September 14 -16, 2010 in Zurich.
23. Ramanayake, S., & Kovoor, T. (1999). *In vitro* micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Horticulture Science and Biotechnology* 74: 265-68.
24. Richardson, F., Saoir, S., & Harvey, B. (1996). A study of the graft union in *in vitro* micrografted apple. *Plant growth regulation* 20: 17-23.
25. Wang, G., Li, X., Chen, Q., & Tian, J. (2010). Studies on factors affecting the micro-shoot grafting survival of walnut. *Acta Horticulture* 861: 327-331.